



Universidad
Zaragoza



PUESTA A PUNTO DE UN BIOSENSOR ÓPTICO ENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Trabajo Fin de Grado en Química

Alba Martín Barreiro



Departamento de Química Analítica

Grupo de Biosensores Analíticos (GBA)

Directora: Susana de Marcos Ruiz

A mis padres y a Pablo, por recorrer conmigo este camino.

*Al Grupo de Biosensores Analíticos y en particular a Susana,
directora de este trabajo, por su ayuda y apoyo durante el desarrollo del mismo.*

Este trabajo ha sido subvencionado con cargo a los proyectos CTQ 2012-34774 del MINECO.

Abstract

The main objective of this work is the optimization of an enzymatic optical biosensor for the determination of hydrogen peroxide. First, the enzymatic reaction of hydrogen peroxide with peroxidase (HRP), has followed through the changes of the absorption properties of the different oxidation states of HRP, both in batch and in continuous by immobilization of HRP in a polyacrylamide film.

Once optimized the development of the sensor film, it has been studied, the analytical and instrumental parameters that affect the response, optimizing the optic unit and evaluating the improvements in the response as a function of the relationship between the concentration and the signal area.

The analytical characteristics of the biosensor such as stability, reversibility, have been studied, obtaining reproducible results even after 60 measurements with the sensor film. This method allows the determination of hydrogen peroxide linear within the range of $1,5 \cdot 10^{-5} - 7,6 \cdot 10^{-4}$ M.

The optimized methodology has been applied in a real sample and the results have been compared with the obtained with a normalized method, establishing the studied method as appropriate for the determination of hydrogen peroxide in real samples.

As a final remark, it has been proposed to extend this methodology to determine other peroxides, so the enzymatic reaction of catalase for the determination of peracetic acid has been studied for this analytical purpose.

Resumen

El objetivo del presente trabajo es la puesta a punto de un biosensor óptico enzimático para la determinación de peróxido de hidrógeno. Como base para el desarrollo del biosensor, se ha estudiado la reacción de este peróxido con la enzima HRP en disolución y entrampada en una red de poliacrilamida en celda de flujo.

Una vez optimizado el desarrollo de la lámina sensora para su implementación en el biosensor óptico, se han estudiado los parámetros analíticos e instrumentales que afectan a la medida, llevándose a cabo la optimización del módulo óptico y evaluándose las mejoras en función de la relación de la concentración con el área de la respuesta. Los estudios han consistido en el rediseño de celda sensora que ha conllevado una disminución de la dispersión de la luz y la elección de los leds de referencia y medida que proporcionan mayor selectividad en el máximo de excitación.

Se han estudiado las características analíticas del biosensor en cuanto a estabilidad y reversibilidad, obteniéndose resultados reproducibles hasta después de 60 medidas con la lámina sensora. El método permite la determinación de peróxido de hidrógeno en un intervalo lineal de $1,5 \cdot 10^{-5} - 7,6 \cdot 10^{-4}$ M.

Tras la optimización se ha aplicado el método a una muestra real y comparando los resultados con la determinación por métodos normalizados, se ha establecido éste como un método adecuado para la determinación de peróxido de hidrógeno en muestras reales.

A partir de este biosensor se ha propuesto ampliar la metodología para la determinación de otros peróxidos, por lo que se han estudiado las posibilidades analíticas de la reacción enzimática de la catalasa para la determinación de ácido peracético.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Biosensor	1
1.1.1 Definición y componentes de un biosensor óptico	1
1.1.2 Características y propiedades	2
1.2 Biosensores enzimáticos	3
1.3 Biosensores basados en reacciones enzimáticas con HRP	3
1.3.1 HRP para la determinación de peróxidos	3
1.3.2 Mecanismo cinético de la reacción entre HRP y H ₂ O ₂	3
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO	4
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	5
3.1 Reactivos y disoluciones.....	5
3.1.1 Reactivos y disoluciones generales	5
3.1.2 Enzimas.....	5
3.1.3 Preparación de la lámina de enzima inmovilizada	5
3.2 Instrumentación y material	6
3.2.1 Instrumentación y material general	6
3.2.2 Analizadores	6
3.3 Procedimiento operativo.....	8
3.3.1 Medidas realizadas con el biosensor óptico enzimático.....	8
3.3.2 Análisis de una muestra real mediante el biosensor óptico enzimático y comparación de los resultados con la determinación por métodos normalizados	9
3.3.3 Medidas realizadas en espectrofotómetro de absorción molecular	9
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4.1 Biosensor para la determinación de peróxido de hidrógeno.....	10
4.1.1 Estudios previos.....	10
4.1.2 Optimización de la lámina de HRP	13
4.1.3 Optimización del módulo óptico del biosensor óptico enzimático	14
4.1.4 Evaluación del tiempo de vida de la lámina y reproducibilidad	18
4.1.5 Intervalo de respuesta lineal	18

4.1.6 Aplicación a una muestra real	19
4.2 Biosensor para la determinación de otros peróxidos	20
4.2.1 Estudio en disolución	20
4.2.2 Estudio en celda de flujo	22
5. CONCLUSIONES	24
6. BIBLIOGRAFÍA	25

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Biosensor

1.1.1 Definición y componentes de un biosensor óptico

Un sensor químico es un dispositivo capaz de transformar la información química sobre un compuesto (analito) en información útil¹. Si esta transformación se lleva a cabo a partir de las propiedades ópticas del sistema sensor, se habla de un sensor químico óptico.

Cuando la información química está basada en un mecanismo bioquímico, como es el caso del trabajo presentado en esta memoria, el sensor recibe el nombre de biosensor. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) define biosensor² como: “Dispositivo basado en las reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas, inmunosistemas, tejidos, orgánulos o células completas para detectar compuestos químicos a través de señales eléctricas, térmicas u ópticas”

En un biosensor químico óptico³ el proceso de transducción de la información se lleva a cabo mediante una secuencia de cuatro etapas:

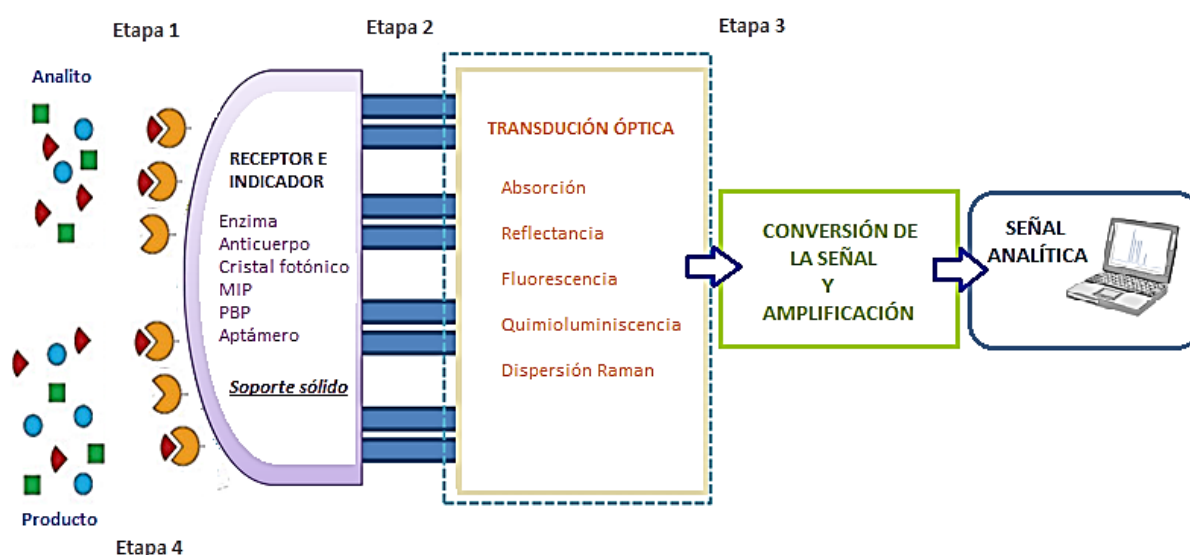


Figura 1. Esquema de un biosensor óptico

- Durante la primera etapa o *etapa de reconocimiento*, el analito reacciona de forma selectiva con el receptor, generando una señal específica que es transmitida al transductor físico-químico. En algunas situaciones, para conseguir esta señal específica, se requiere la presencia de un reactivo adicional denominado indicador; en el caso de que este indicador sea el propio sistema de reconocimiento el biosensor se considera autoindicador. El receptor químico ha de estar inmovilizado en un soporte sólido, bien sea química o físicamente, y es responsable de la selectividad frente al analito y la calidad del biosensor.
- Durante la segunda etapa o *etapa de transducción*, la señal que proviene de la interacción con el analito es convertida en señal eléctrica, que es el modo de entrada al siguiente componente y donde comienza la tercera etapa o *etapa de conversión* a señal analítica útil. El tipo de señal generada, como consecuencia de la interacción entre el analito y el receptor, es la responsable

del tipo de transductor empleado para su detección y caracteriza el tipo de biosensor. El sistema de transducción, en biosensores ópticos, se denomina detector y puede ser de absorción, fluorescencia, fosforescencia, etc.

- Durante la cuarta y última etapa o *etapa de regeneración*, el dispositivo retorna a la situación química inicial, de tal forma que puede ser empleado para un nuevo ciclo de reacción con el analito. Esta capacidad de regeneración del sistema de reconocimiento es responsable de la autonomía del biosensor.

Desde el punto de vista químico éstas son las etapas que han de tenerse en cuenta a la hora del diseño de un biosensor óptico, pero no hay que olvidar que en el diseño final de un prototipo comercial hay que tener en cuenta la necesidad adicional de:

- Fuentes de radiación: para favorecer la especificidad del dispositivo, a la vez de hacerlo asequible y de pequeño tamaño, se suelen utilizar diodos de luz (leds) o láseres portátiles. La elección de la fuente está condicionada por la zona del espectro de la radiación electromagnética que se va a utilizar para la transducción óptica.
- Detectores: Se suelen incorporar fotodiodos o dispositivos de carga acoplada (CCDs). El tipo de detector va a condicionar la sensibilidad del dispositivo.

1.1.2 Características y propiedades

Algunas de las propiedades que diferencian un biosensor de las técnicas analíticas convencionales son, el análisis rápido (en tiempo real), facilidad de uso, técnicas baratas, portátiles y miniaturizables, en su mayoría técnicas monoanalito, necesidad de un volumen reducido de muestra, mínimo pre-tratamiento de muestra, sensibles, precisos y fiables.

En el caso de los receptores, las principales características que se buscan a la hora de seleccionar el tipo de receptor son selectividad, estabilidad y rango amplio de respuesta. Sin embargo, existen una serie de características adicionales que son determinantes a la hora de seleccionar un receptor adecuado:

1. Autoindicador: El receptor ha de poseer propiedades espectroscópicas que varíen como consecuencia de la interacción o de la reacción con el analito. En la mayoría de los casos el receptor no posee intrínsecamente estas propiedades y deben ser incorporadas (absorción o fluorescencia inducida).
2. Simple y robusto: El mecanismo de reconocimiento pueda ser representado como una reacción única entre el analito y el receptor, y no dependa de otras condiciones químicas como el pH o la adición de reactivos adicionales. Adicionalmente es deseable que el parámetro analítico de calibración tenga una relación lineal con la concentración del analito.
3. Reversible: La actividad del receptor se ha de poder regenerar por completo tras la reacción preferentemente, sin necesidad de un reactivo adicional, de tal forma que pueda ser utilizado en análisis sucesivos. Es decir, el sensor permita realizar medidas en continuo.

1.2 Biosensores enzimáticos

El uso de proteínas como reactivos en métodos analíticos constituye una importante opción a tener en cuenta y se fundamenta en la capacidad que tienen las proteínas de interactuar más o menos específicamente con determinadas moléculas mediante un proceso que simula la interacción bioquímica en un organismo vivo, por ello se las conoce como reactivos de biorreconocimiento molecular⁴. Cuando las proteínas se quieren utilizar como receptores para el diseño de sensores, a la selectividad hay que añadirle, al menos, una condición adicional, la reversibilidad de la reacción, la cual se cumple en la mayoría de los casos. El uso de estas como base para el diseño de procedimientos analíticos requiere además que se origine una señal analítica tras su interacción con el analito de interés.

1.3 Biosensores basados en reacciones enzimáticas con HRP

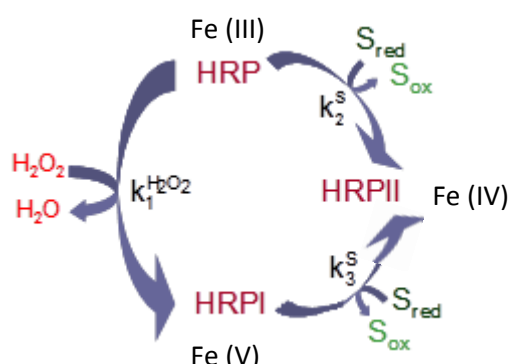
1.3.1 HRP para la determinación de peróxidos

El alto poder biocida⁵ de la combinación del ácido peracético con el peróxido de hidrógeno convierte estos peróxidos en un producto altamente eficiente en la eliminación de microorganismos, virus, bacterias y hongos, se trata de productos de baja toxicidad ya que se descomponen en agua, oxígeno y ácido acético, por lo que su utilización no daña el medioambiente, a diferencia de otros productos oxidantes no genera subproductos tóxicos, como ocurre con el cloro y los formaldehídos, lo cual hace a los peróxidos la mejor opción en el uso de biocidas para el tratamiento de aguas.

1.3.2 Mecanismo cinético de la reacción entre HRP y H_2O_2

Las peroxidasas son un tipo de enzimas que pertenecen a la categoría de oxidorreductasas, prácticamente todas ellas son hemoproteínas y tienen como sustrato común el H_2O_2 .

Las peroxidasas⁶ (HRP) catalizan la oxidación de diferentes sustratos (S) con H_2O_2 de acuerdo con el siguiente esquema general:



Esquema 1. Mecanismo de reacción de HRP.

En el estado nativo de la peroxidasa el grupo hemo contiene Fe (III). En la etapa de oxidación HRP reacciona con H_2O_2 para generar un intermedio denominado HRPI cuyo grupo hemo presenta un estado de oxidación formal +5. La regeneración de la HRP es llevada a cabo por sustratos reductores: primero HRPI es reducido a HRPII, cuyo grupo hemo presenta un estado de oxidación formal +4, y después HRPII es reducido a HRP. El valor descrito para $k_1^{H_2O_2}$ es de $1,0 \cdot 10^7$ a $1,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, mientras que los valores para k_2^S y k_3^S dependen del sustrato. Los valores descritos en la bibliografía para las diferentes constantes cinéticas indican que la última etapa de reducción es la limitante del proceso⁷.

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

Como se ha comentado en la introducción los peróxidos tienen multitud de aplicaciones de tipo industrial, siendo una de las más importantes su empleo como desinfectante en aguas de diferente naturaleza. En estos casos es frecuente combinar el uso de H_2O_2 con otros peróxidos, fundamentalmente ácido peracético, por lo que es normal encontrarlos juntos en muestras de aguas tratadas con este biocida.

Este uso de los peróxidos hace que sea interesante desarrollar metodología analítica para su determinación de forma rápida, sencilla y continua.

El objetivo principal de este trabajo es la puesta a punto de un biosensor óptico enzimático para la determinación de peróxidos mediante su reacción con HRP inmovilizada, con el fin de encontrar unas condiciones analíticas e instrumentales óptimas del sistema para su uso. En concreto se propone:

1. Estudio de la reacción enzimática en disolución de HRP con peróxido de hidrógeno.
2. A partir de la inmovilización de la enzima en una lámina sensora, estudio de la reacción enzimática en celda de flujo.
3. Desarrollo y optimización de una lámina sensora de HRP, mediante la inmovilización de la enzima seleccionada, que sirva como base para el desarrollo del biosensor.
4. Elección del parámetro analítico.
5. Optimización del módulo óptico: Rediseño de celda sensora y elección de los leds de referencia y medida.
6. Estudio y establecimiento de las condiciones de medida.
7. Estudio las características analíticas del biosensor en cuanto a la estabilidad y reversibilidad: evaluación del tiempo de vida de la lámina y reproducibilidad.
8. Obtención del intervalo lineal de respuesta una vez implementadas las mejoras.
9. Evaluación de la optimización realizada mediante el análisis de una muestra real y comparación de los resultados con la determinación por métodos normalizados.

Por otro lado, buscando completar la determinación de este tipo muestras, se pretende también estudiar las posibilidades de la reacción enzimática de la catalasa para la determinación de peróxidos y evaluar así las posibilidades de este sistema como analizador portátil de diversas reacciones enzimáticas.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reactivos y disoluciones

3.1.1 Reactivos y disoluciones generales

- Disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ 0,1M pH=6 y pH=8: se prepara disolviendo 3,65 g de NaH_2PO_4 (Panreac 122018.1211) en 300 mL de H_2O miliQ y se ajusta el pH con una disolución de NaOH 2M.
- Disolución de L-Tirosina (T3754 Sigma-Aldrich) 0,1M: se disuelven 90,8 mg de L- tirosina en 5 mL de NaOH 2M.
- Disolución amortiguadora con L-Tirosina $2,5 \cdot 10^{-5}$ M: Añadiendo 50 μL de la disolución de L-Tirosina 0,1M a 200 mL de disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ 0,1M.
- Disolución de persulfato amónico $((\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8)$ 4% (w/v): Se prepara disolviendo 40 mg de persulfato amónico (A3678 Sigma) en 1 mL de H_2O_2 miliQ.
- Disolución comercial de N,N,N',N' - Tetrametiletilenodiamina (TEMED), Biorad.
- Disolución comercial de peróxido de hidrógeno, H_2O_2 33% (m/V) (Panreac 131077.1211).
- Disoluciones de peróxido de hidrógeno preparadas por dilución de la disolución comercial en disolución amortiguadora.
- Agua oxigenada comercial BONTÉ (estabilizada 10 vol., peróxido de hidrógeno al 3%).
- Disolución comercial de ácido peracético 39% (w/v) (77240 Sigma).
- Disoluciones de ácido peracético preparadas por dilución de la disolución comercial en disolución amortiguadora.

3.1.2 Enzimas

- Peroxidasa (HRP) (EC 1.11.1.7) Sigma P8125, 52 U/mg (Peroxidase from Horseradish).
- Catalasa (EC 1.11.1.6) Sigma C40, 10,000 U /mg (Catalase from bovine liver).

3.1.3 Preparación de la lámina de enzima inmovilizada

De todos los métodos de inmovilización de enzimas⁸ (adsorción, unión covalente, entrapamiento...), se ha visto que el que mejor resultado tanto por eficacia de inmovilización como por accesibilidad al centro activo, es el entrapamiento de la proteína en una lámina de poliacrilamida (PAA), para ello se sigue el protocolo⁹ mostrado a continuación:

- Disolución de PAA: en un vial se disuelven 75 mg de acrilamida (A3553 Sigma) y 5 mg de N,N'- Metilenbisacrilamida (M7279 Sigma) en 200 μL de disolución amortiguadora.
- Disolución de enzima: en un vial se disuelve la cantidad de enzima necesaria en el caso de cada lámina.
 - Lámina de peroxidasa: para ello se disuelven 7,5 mg de HRP en 200 μL de disolución amortiguadora pH=6 (Disolución peroxidasa $3,125 \cdot 10^{-4}$ M).
 - Lámina de catalasa: para ello se disuelven 5,5 mg de HRP en 200 μL de disolución amortiguadora pH=8 (Disolución catalasa $5,53 \cdot 10^{-5}$ M).
- Se mezclan la disolución de PAA y de enzima.
- Se añaden 5 μL de $((\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8)$ 4% (m/V).

- Se desoxigena la mezcla borboteando N_2 durante 1 minuto.
- Se añaden 2 μL de TEMED.
- Se deposita esta mezcla en los moldes o celdas correspondientes, se cubre con un porta (para evitar que este en contacto con el aire) y se deja que polimericen durante 2 horas, transcurrido este tiempo se guardan las láminas en viales o en la celda con disolución amortiguadora. (Anexo1)

3.2 Instrumentación y material

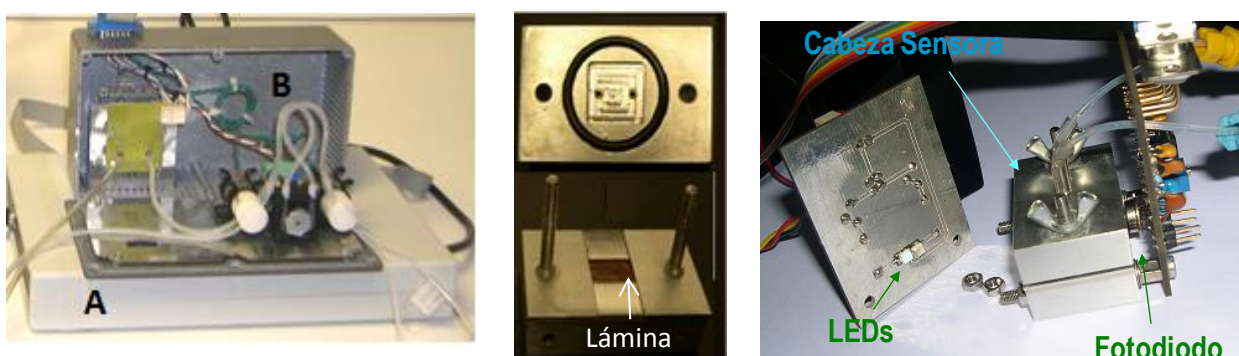
3.2.1 Instrumentación y material general

- pH-metro CRISON, Basic 20, para la realización de las medidas de pH.
- Balanza analítica de precisión. GR-202-EC (máx. 210g, min. 1mg).
- Agitador Magnético A-01, SBS.
- Micropipetas de volumen variable: Socorex (5-50 μL , 10-100 μL y 100-1000 μL) y Pipetman Gilson (2-20 μL , 50-200 μL y 200-1000 μL).
- Matraces de 10 mL y 25 mL.
- Vasos de precipitados de 10 mL, 100 mL y 300 mL.
- Vidrio de reloj.
- Probetas, buretas y pipetas graduadas.
- Material desechable: viales, tubos falcon, pipetas pasteur, puntas de micropipetas.

3.2.2 Analizadores

a) Biosensor óptico enzimático:

Este dispositivo está compuesto por dos módulos que se conectan a un ordenador que recoge información de las medidas mediante un software de control y procesado de señal, desarrollado por el Servicio de Instrumentación Científica de la Universidad de Zaragoza.



El primer módulo (B) contiene todos los componentes electrónicos y circuitos necesarios en la transducción de la señal. El segundo módulo (A) contiene la cabeza sensora (celda de medida, leds y fotodiodo) y el sistema hidrodinámico (Anexo 2) (bomba peristáltica y válvulas de tres vías, que permiten ciclos de lavado e inyección automáticos).

a.1) Módulo óptico e hidrodinámico

- Dos válvulas de tres vías: permiten la distribución de la muestra y el portador, a través de la celda o hacia el desecho.
- Minibomba peristáltica: que impulsa la disolución.
- Cabeza o celda sensora.
- Leds: se utilizan como fuente de excitación, uno de referencia y otro de medida.
- Detector: Fotodiodo de Silicio. UV-IR cercano (300-1000 nm)

a.2) Módulo electrónico (Anexo 3)

Incluye todos los circuitos y componentes electrónicos para el control del sistema. Se puede regular la intensidad luminosa de los leds girando los tornillos que los controlan y que se encuentran situados en este módulo.

a.3) Software y procesamiento de la señal

El software permite configurar los parámetros de medida y controlar los resultados desde el ordenador.

▪ Configuración:

- Frecuencia de adquisición (Hz): 1Hz
- Velocidad de la bomba: Se describe en tanto por ciento (%), se relaciona con el caudal de la disolución en $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ mediante la correspondiente calibración de la bomba. En ese trabajo se ha utilizado un 35% que corresponde a un caudal de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.
- Numero de medidas: número de veces que mide la muestra en cada ciclo.
- Pre Time (min): tiempo que se tarda en llenar el circuito, 2 min.
- Post Time (min): tiempo que transcurre entre dos ciclos de medidas, 2min.
- Lavado - carga (min): tiempo en que la muestra está llenando el bucle sin pasar por la celda, 2 min.
- Regeneración (min): tiempo que el portador está pasando por la celda.
- Inyección (min): Antes de empezar la regeneración, la muestra continua pasando por la celda, de forma que podemos aumentar la cantidad de muestra que introducimos en la celda (se suma a la cantidad de muestra que introducimos con el bucle cargado en la etapa lavado - carga).

b) Espectrofotómetro de absorción molecular:

- Espectrofotómetro de fotodiodos UV-Vis Agilent 8453A, que permite medir entre 190-1100 nm.
- Adaptadores intercambiables que permiten medir en cubeta y en celda de flujo.
- Sistema Peltier Hewlett Packard 89909.
- Celda de flujo. (Anexo 4)
- Cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

3.3 Procedimiento operativo

3.3.1 Medidas realizadas con el biosensor óptico enzimático

1. Se coloca la lámina sensora en la celda sensora, en un espacio limitado por dos cristales con el borde pulido que son atravesados por la radiación de los leds. Esta celda se cierra con una tapa que posee dos vías (entrada y salida) para el flujo de la disolución y una cámara, cerrada con la ayuda de una goma de plástico, por donde fluye la disolución bañando la lámina.
2. Se preparan las disoluciones necesarias y se colocan en sus respectivos flujos de entrada. Por un lado la disolución amortiguadora con L-Tirosina $2,5 \cdot 10^{-5} M$ (actúa como sustrato favoreciendo la regeneración de la enzima a su estado de oxidación inicial), que será el portador y por otro las disoluciones de peróxido de hidrógeno o ácido peracético (según la enzima utilizada) en distintas concentraciones, preparadas por dilución de la disolución comercial en disolución amortiguadora.
3. Se conectan todas las conducciones, entrada a la celda y salida al desecho.
4. Se ajusta la intensidad de leds y fotodiodo.
5. Se configuran desde el software todos los parámetros anteriormente explicados.
6. Se tapa el sistema de la entrada de luz externa.

Tras cargar la muestra en el bucle en la etapa lavado-carga, comienza la etapa de regeneración, en la primera medida esta etapa sirve para asegurar que todo el sistema, celda incluida, está llena de la disolución portadora. En las siguientes ocasiones, la disolución portadora arrastra la muestra contenida en el bucle y la lleva a la celda. El tiempo de regeneración es, por tanto, el tiempo de llegada de la muestra a la celda y el que la lámina dispone para regenerarse con la disolución portadora, depende así de la velocidad de respuesta de la lámina y de la velocidad de regeneración. (Anexo 5)

En la pantalla se puede seguir la reacción y el estado de los ciclos, así, después de cada lavado-carga, podremos cambiar la disolución de reactivo de entrada sin afectar a la medida que se está llevando a cabo.

➤ Procesado y obtención de la señal:

El sistema registra la intensidad y la transforma en absorbancia. Por un lado se obtienen los cambios de voltaje respecto al tiempo, producidos por cada led, de referencia y de medida. Por otro lado, se obtiene la señal transformada en absorbancia, mediante la relación empírica de Lambert-Beer (1), frente al tiempo.

$$Abs = -\log \frac{I_{Led\ de\ medida}}{I_{Led\ de\ referencia}} \quad (1)$$

Todos estos datos se registran guardándose en un fichero. Mediante la representación de los valores de absorbancia frente a tiempo se extraen los picos de respuesta, de cuyo tratamiento, se obtienen los parámetros analíticos (áreas o alturas) que se relacionan con la concentración de muestra que ha reaccionado con la enzima entrampada en la celda sensora.

3.3.2 Análisis de una muestra real mediante el biosensor óptico enzimático y comparación de los resultados con la determinación por métodos normalizados

- Para el análisis de la muestra en el biosensor óptico, se coloca la celda con la lámina de HRP preparada y se introducen tres disoluciones de peróxido de hidrógeno patrón de concentraciones que cubran todo el rango lineal. Se prepara por dilución una disolución a partir de agua oxigenada comercial y se introduce en el flujo.
- Para la comparación de los resultados se va a valorar la misma disolución diluida de agua oxigenada comercial con una disolución de permanganato potásico, como agente valorante, de concentración conocida (método normalizado¹⁰). Se toman, con pipeta, 25 mL de una disolución de H_2O_2 y se trasvasan cuantitativamente a un erlenmeyer. Se adicionan 10 mL (con probeta) de disolución diluida de ácido sulfúrico (1:5) y se diluye con agua desionizada hasta, aproximadamente, 100 mL. A continuación se valora con disolución de MnO_4^- 0,02 M hasta la aparición del primer tono 'rosa' en la disolución.

3.3.3 Medidas realizadas en espectrofotómetro de absorción molecular

Para evaluar las posibilidades de la reacción enzimática de la catalasa para la determinación de peróxidos, (en este caso ácido peracético) y su implementación en el sensor óptico, se van a realizar los estudios en disolución y en celda de flujo en espectrofotómetro de absorción molecular.

➤ Estudio en disolución:

En primer lugar se realizará el espectro de la enzima en disolución, se añade en una cubeta de cuarzo (de volumen reducido) 500 μL de disolución de catalasa $7,33 \cdot 10^{-6}$ M y se obtiene el máximo de excitación. Después, a la misma cantidad de catalasa se le añaden 475 μL de disolución amortiguadora y se coloca la cubeta en el compartimento de muestra con agitación, se mide en el máximo de excitación en modo cinético y a un tiempo determinado se añade a la cubeta, con la ayuda de una micropipeta, 25 μL de ácido peracético de las concentraciones de interés.

➤ Estudio en celda de flujo:

Las medidas en continuo se realizan en una celda de flujo, diseñada para colocar la lámina sensora en su interior, que mediante el adaptador correspondiente, se coloca en el compartimento de muestra del espectrofotómetro. Para poder realizar las medidas en continuo, se dispone de una bomba peristáltica, con la que se puede modificar el flujo de disolución que pasa a través de la celda donde se encuentra la lámina. (Anexo 6)

Se coloca la lámina de catalasa en la celda de flujo y se opera igual que en el caso anterior obteniendo el máximo de excitación. Después se conecta la celda de flujo, mediante conducciones, a la bomba peristáltica, que a un caudal controlado de 1 mL/min tomará disolución amortiguadora con tirosina, haciéndola pasar por la celda de flujo. Se realizan medidas en continuo en el máximo de excitación, de tal forma que a un tiempo determinado, se detiene el flujo y se cambia la disolución amortiguadora por disolución de ácido peracético que se hace pasar durante 45 segundos, tras ello, se vuelve a introducir la disolución amortiguadora en la celda.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Biosensor para la determinación de peróxido de hidrógeno

4.1.1 Estudios previos

4.1.1.1 Estudio en disolución

Teniendo en cuenta que el objetivo principal del trabajo es poner a punto un biosensor óptico enzimático para la determinación de peróxido de hidrógeno mediante su reacción con peroxidasa, se va a comenzar con el seguimiento de la reacción enzimática entre HRP y H_2O_2 a partir de las propiedades espectroscópicas de la enzima, realizándose para ello el espectro de absorción molecular de la enzima.

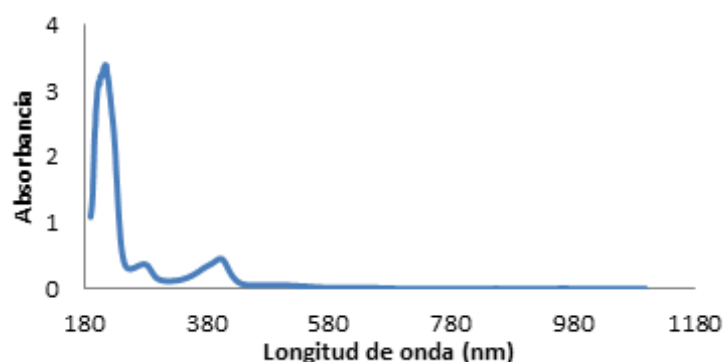


Figura 1. Espectro de absorción molecular de peroxidasa 97,52 U/mL.

En la figura se observa que la HRP presenta Absorción Molecular en la zona del UV (con máximos entre 220 y 270 nm), este hecho es debido a la presencia de aminoácidos aromáticos. Esta zona la vamos a descartar para trabajar, debido a que es poco útil ya que hay muchas especies que absorben en este rango y por lo tanto no se podría seguir bien la reacción enzimática.

La otra zona que absorbe es en la zona del Visible (en torno a 400 nm), esta absorción es debida al centro metálico de Fe que tiene la HRP. Esta zona es más adecuada que la del UV, ya que hay muchas especies que absorben a estas longitudes de onda, por lo tanto se va a seguir la reacción a través de las variaciones de la señal en esta región de 400 nm.

Una vez analizados los espectros de absorción molecular de la enzima, se realiza el seguimiento de la reacción con H_2O_2 , la peroxidasa presenta un espectro de absorción molecular que depende del estado de oxidación del grupo hemo, por lo que los cambios observados en este espectro⁶ se pueden utilizar para realizar el seguimiento de la reacción enzimática.

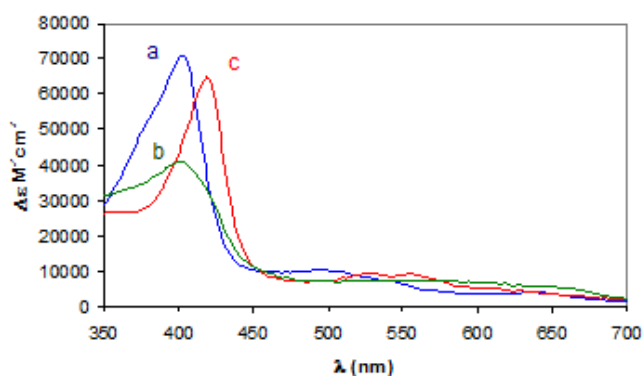


Figura 2. Espectro de absorción molecular de la peroxidasa. (a): HRP; (b): HRPI; (c): HRPII.

HRP presenta máximos a 402 y 500 nm. HRPI presenta máximos a 402, 550, 618 y 648 nm y HRPII presenta máximos de absorción a 420, 527 y 554 nm. Aunque es posible realizar el seguimiento de la reacción enzimática en todo el espectro, para una mayor simplicidad se mostrarán en la mayoría de los casos los resultados obtenidos a 420 nm.

Estudios anteriores⁶ demostraron que trabajando en exceso de peroxidasa se obtiene una relación lineal con la concentración de peróxido, según el modelo matemático que proporciona la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{\Delta \text{Abs}_{t,\lambda}} = \frac{K_a^{\text{HRP}}}{\Delta \epsilon_{\lambda} A} (1 - 10^{-A t}) + \frac{10^{-A t}}{\Delta \epsilon_{\lambda} [\text{H}_2\text{O}_2]_0}$$

Para el desarrollo de este trabajo se tomarán estas condiciones de partida, es decir, exceso de peroxidasa, por lo cual se aplicará a los resultados el modelo matemático citado, cabiendo esperar la existencia de una relación lineal entre la inversa de la señal de absorbancia y la inversa de la concentración.

En primer lugar se obtuvieron los espectros tras hacer reaccionar la misma cantidad de HRP (97,52 U/mL) con diferentes concentraciones de H_2O_2 . Mediante la representación de la ΔAbs_{420} en función de la concentración de peróxido de hidrogeno adicionada, se obtienen los datos que se representan en la siguiente figura.

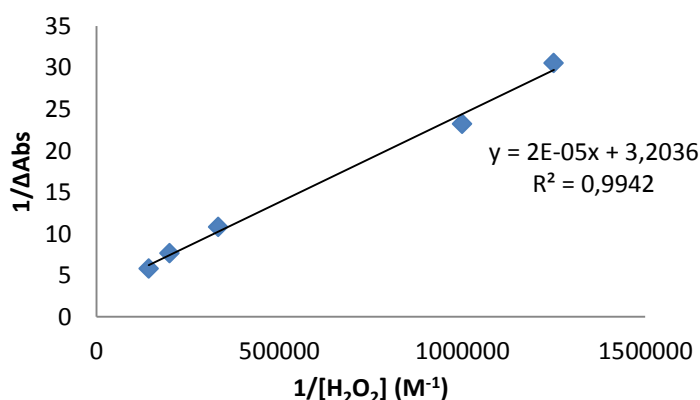


Figura 3. Relación entre la inversa de la variación de Abs a 420 nm de una disolución de HRP 97,52 UI/mL y la inversa de la concentración de H_2O_2 en disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1M pH=6.

Como se puede comprobar, realizando un ajuste lineal por mínimos cuadrados, el método presenta un intervalo de respuesta lineal de $8 \cdot 10^{-7}$ - $7 \cdot 10^{-6}$ M.

Por otra parte, en trabajos anteriores¹¹ se ha comprobado que la regeneración de la HRP a su estado de oxidación inicial se favorece con una concentración de L-Tirosina de $2,5 \cdot 10^{-5}$ M.

4.1.1.2 Estudios en celda de flujo

La finalidad de estos estudios se centra en incorporar esta reacción enzimática en una lámina sensora, mediante la inmovilización de la enzima HRP, que sirva como base para el desarrollo del biosensor.

Antes de la implementación de la lámina al sensor óptico enzimático, con el fin de obtener una información más completa de la respuesta y las características de la lámina sensora, se estudió la reacción en celda de flujo en el espectrofotómetro de absorción (Anexo 6).

En primer lugar se obtuvo el espectro de absorción molecular de la enzima entrampada en la red de PAA.

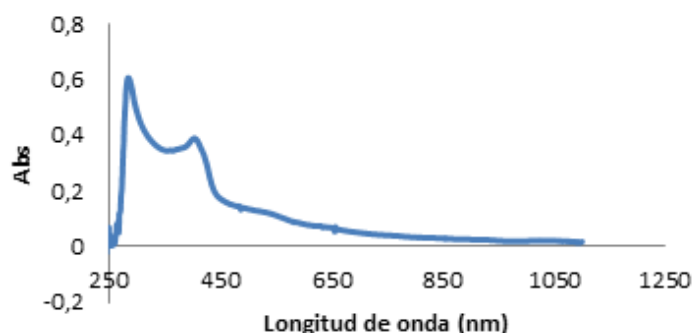


Figura 4. Espectro de absorción molecular de peroxidasa 52 U/mL en lámina sensora.

En la figura se observa el máximo de absorbancia en torno a 400nm, igual que sucedía en disolución.

Mediante el estudio de la reacción en celda de flujo, se observa que la enzima presenta un mismo comportamiento que en disolución. Representando el registro cinético a 400 y 420 nm se obtienen respuestas del siguiente tipo:

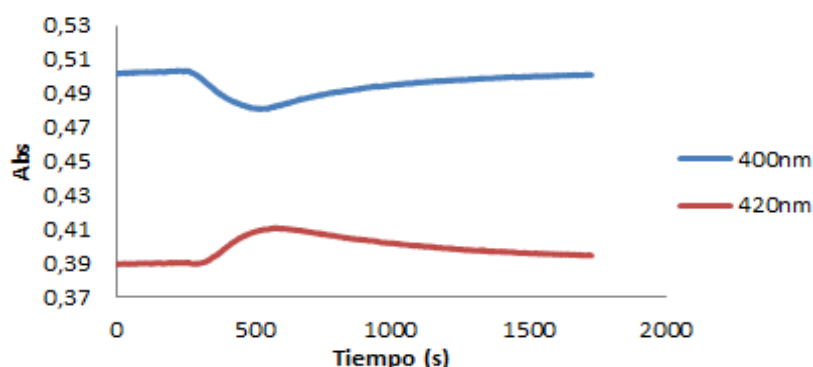


Figura 5. Registro cinético a 400 y 420 nm de la reacción entre una lámina de PAA de HRP 52 UI/mL y H_2O_2 $1 \cdot 10^{-4}$ M con flujo de 1 mL/min en disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1M pH=6.

En diferentes estudios se obtuvieron los espectros cinéticos de reacción con diferentes concentraciones de H_2O_2 . Mediante la representación de la ΔAbs , producida por la formación del producto, según la cantidad de peróxido de hidrógeno adicionada, se obtienen los datos que se representan en la siguiente figura.

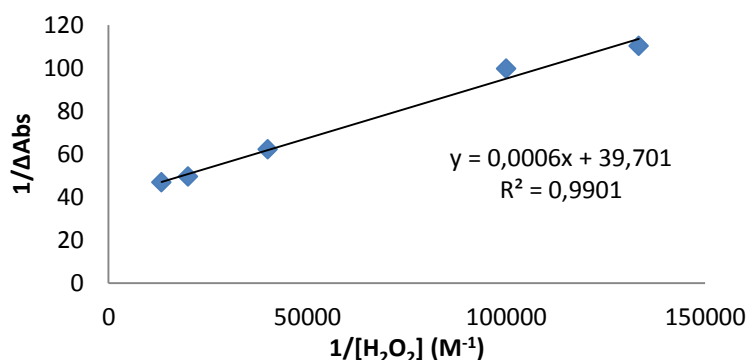


Figura 6. Relación entre la inversa de la variación de Abs de una lámina de HRP 52 UI/mL y la inversa de la concentración de H_2O_2 en disolución amortiguadora $H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$ 0,1M pH=6.

Como se puede comprobar, realizando un ajuste lineal por mínimos cuadrados, el método presenta un intervalo de respuesta lineal de $7,5 \cdot 10^{-6}$ - $7,5 \cdot 10^{-5}$ M.

4.1.2 Optimización de la lámina de HRP

A partir de aquí se comenzó a trabajar en el diseño del biosensor óptico enzimático. En primer lugar se trabajó con el protocolo de preparación de la lámina, cuyos parámetros han sido optimizados para su implementación en la celda de flujo, por lo que a la hora de utilizarlos en la celda del biosensor se observan problemas que pueden ser debidos a la diferencia en el tamaño o espesor (características físicas) de esta lámina en comparación a la realizada para la celda de flujo, como son, su apariencia en ocasiones blanquecina y el deterioro rápido de la enzima (pérdida de señal). Esto indicaba un problema en el agente catalizador de la polimerización (persulfato de amonio como agente oxidante y TEMED como agente reductor) que desnaturizaba y deterioraba parte de la enzima.

En el protocolo de partida se añadían 2 μ L de persulfato amónico $((NH_4)_2S_2O_8)$ 10% (w/v) para una disolución final de 400 μ L, con el fin de aumentar el volumen de persulfato añadido y poder descartar problemas de imprecisión de las micropipetas debido al bajo volumen tomado, se preparó $(NH_4)_2S_2O_8$ al 4% (w/v) y se añadieron 5 μ L de ésta para una disolución final de 400 μ L. Se comparó la respuesta de ambas láminas en las mismas condiciones de medida y para una misma concentración de H_2O_2 y se pudo comprobar que trabajando con persulfato al 4% las láminas eran más estables y reproducibles, por lo que a partir de aquí se trabajó en estas condiciones.

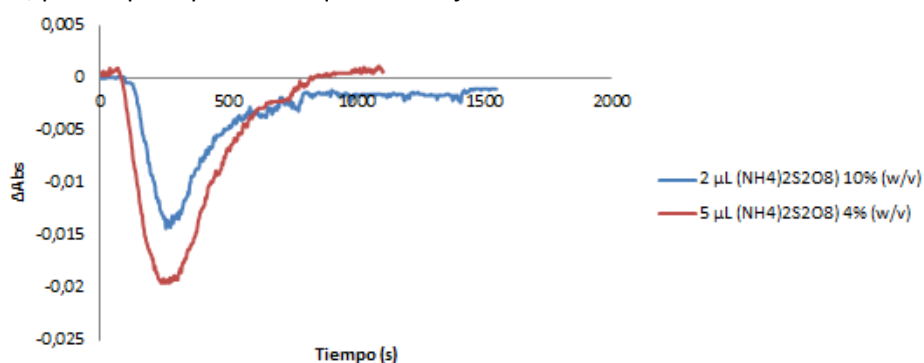


Figura 7. Variación de Absorbancia a 470 nm de HRP bajo las mismas condiciones de medida en función del volumen de persulfato amónico añadido en la preparación de la lámina sensora.

4.1.3 Optimización del módulo óptico del biosensor óptico enzimático

Como ya se ha explicado el sensor óptico usa como fuente de emisión la luz led (diodo emisor de luz), éstos ofrecen algunas ventajas en comparación con otras fuentes de luz utilizadas en aplicaciones optoelectrónicas que incluyen mayor tiempo de vida, bajo costo, menor consumo de energía, mayor brillo, construcción robusta, configuración flexible, pequeño tamaño y un amplio intervalo espectral, pero su inconveniente es que aunque en teoría seleccionan una única longitud de onda y la luz debería ser monocromática, en la práctica esto no ocurre así, sino que todos los leds abarcan un intervalo de longitudes de onda entorno a la seleccionada, lo cual se traduce en una pérdida de la selectividad.

Además, a pesar de que el modelo matemático desarrollado⁵ establece una relación lineal entre la diferencia de alturas y la concentración de peróxido de hidrógeno, el hecho de trabajar con leds que proporcionan la variación de señal global, en el intervalo de longitudes de onda en el que emiten, se consideró como más adecuada la utilización de la variación total de la señal (área, zona rayada en la figura 8).

Debido a que, como se ha indicado, se va a realizar el seguimiento de la reacción enzimática a 420 nm, en primer lugar se procede al estudio de la misma mediante un sistema con dos leds uno a 420 nm y otro a 470 nm (utilizado como referencia):

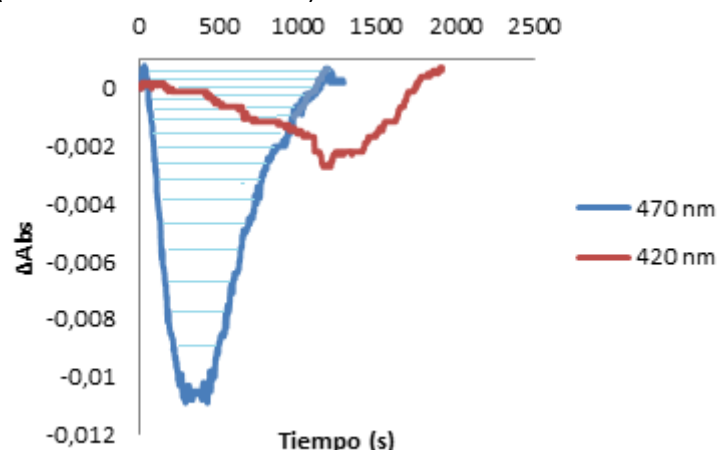


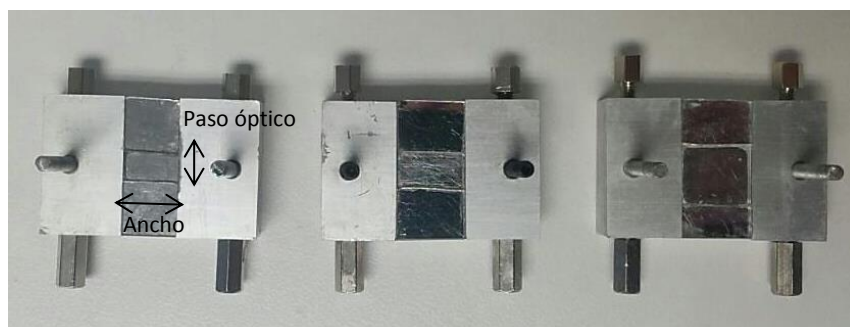
Figura 8. Variación de la absorbancia de la reacción entre una lámina HRP 52 UI/mL y H_2O_2 $5 \cdot 10^{-4}$ M con los leds de 420 y 470 nm.

En la figura se puede observar como el cambio para el led de 470 nm se ve con mayor claridad y proporciona una señal mucho más grande y sensible que para el led de 420 nm, debido a su intervalo de longitud de onda de respuesta.

Por tanto, se decide probar dos placas de leds (Anexo7), una la ya citada con los leds de 420 y 470 nm (placa A) y otra con dos leds de 470 y 525 nm (placa B), con la intención de que ésta última proporcione señales más sensibles y el led de 525 trabaje mejor como referencia restando a la señal de 470 el ruido o las posibles derivas de la señal.

Por otra parte, con la finalidad de mejorar el módulo óptico y conseguir también una mejora en la sensibilidad de las medidas, se construyeron tres celdas sensoras en las que variaban diversos parámetros. Se modificó el ancho del espacio donde se sitúa la lámina, con la intención de

comprobar que al aumentarlo se producía un aumento de la focalización y una menor dispersión de la luz del led. También se varió el paso óptico, con el fin de conseguir un aumento de la sensibilidad.



En esta imagen se pueden observar de izquierda a derecha; celda A, celda B, celda C. La celda A y la celda B comparten mismo paso óptico pero la celda B tiene mayor ancho. La celda B y la C comparten mismo ancho pero la celda C tiene mayor paso óptico.

En primer lugar se estudió la reacción de la lámina HRP con una misma concentración de H_2O_2 en cada celda y con cada par de leds:

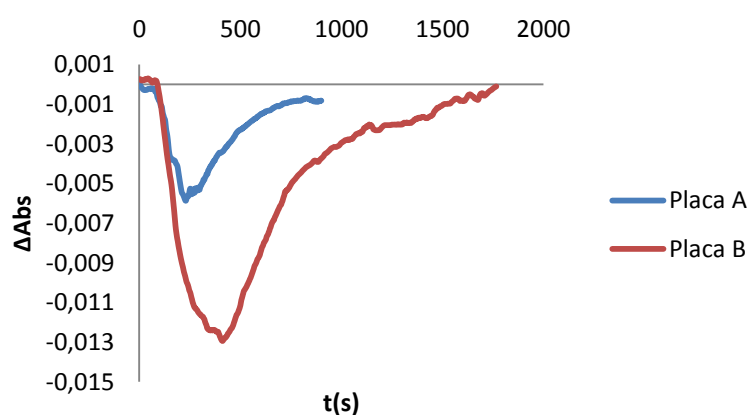


Figura 9. Variación de la absorbancia de la reacción entre una lámina HRP 52 UI/mL y H_2O_2 $5 \cdot 10^{-4}$ M con las placas A y B usando la celda A.

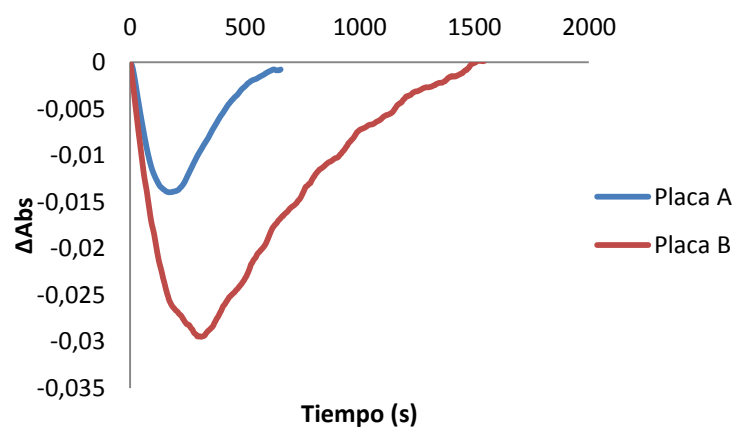


Figura 10. Variación de la absorbancia de la reacción entre una lámina HRP 52 UI/mL y H_2O_2 $5 \cdot 10^{-4}$ M con las placas A y B usando la celda B.

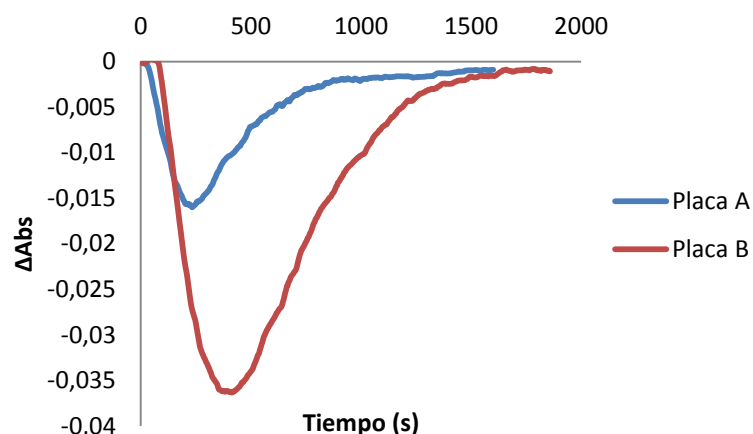


Figura 11. Variación de la absorbancia de la reacción entre una lámina HRP 52 UI/mL y H_2O_2 $5 \cdot 10^{-4}$ M con las placas A y B usando la celda C.

Como se puede observar en las tres figuras anteriores, con la placa B (470 y 525 nm) se consiguen respuestas mayores y más sensibles.

A modo de resumen se presenta la tabla 1, donde se recogen las áreas de cada una de las señales anteriores:

	Áreas		
	Celda A	Celda B	Celda C
Placa A	0,0296	0,0624	0,0580
Placa B	0,0599	0,1863	0,1822

Tabla 1. Áreas extraídas de las señales proporcionadas en las figuras 9, 10 y 11.

Se realizó también un estudio de la reacción de la lámina HRP con diversas concentraciones de H_2O_2 en cada celda y con cada par de leds, obteniéndose respuestas del tipo:

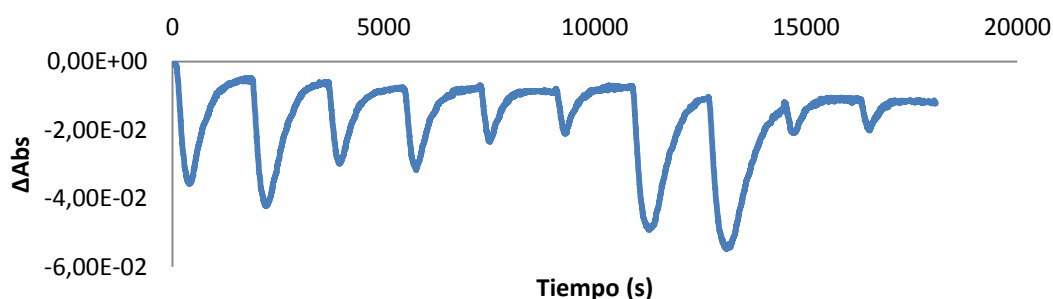


Figura 12. Variación de la absorbancia de la reacción entre una lámina HRP 52 UI/mL y H_2O_2 en distintas concentraciones usando la placa B y la celda C.

Tratando cada uno de los picos se obtuvieron las áreas para cada una de las concentraciones. Tras realizar un ajuste lineal por mínimos cuadrados de la inversa de las áreas y las inversas de las concentraciones se extrajeron las siguientes representaciones:

Usando la placa A y variando las diferentes celdas siempre para las mismas concentraciones de H_2O_2 , se obtienen los datos que se representan en la siguiente figura.

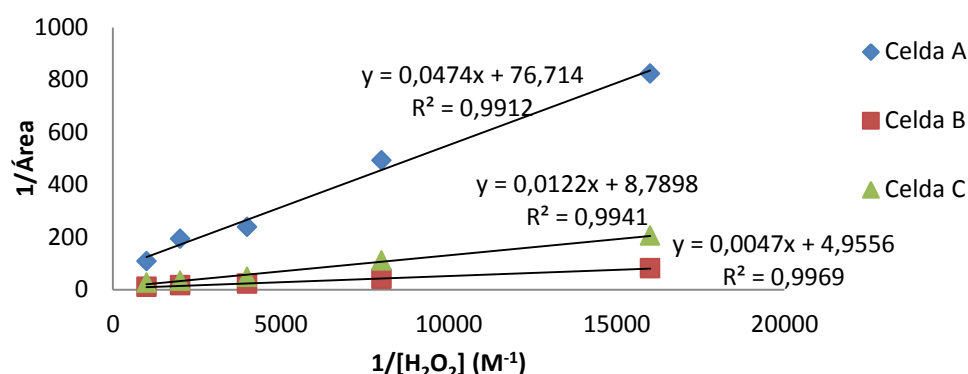


Figura 13. Relación entre el inverso del área dada por las señales de absorbanza de la lámina HRP 52 UI/mL y el inverso de la concentración de H_2O_2 en la celda A, B y C con la placa A.

Usando la placa B y variando las diferentes celdas siempre para las mismas concentraciones de H_2O_2 , se obtienen los datos que se representan en la siguiente figura.

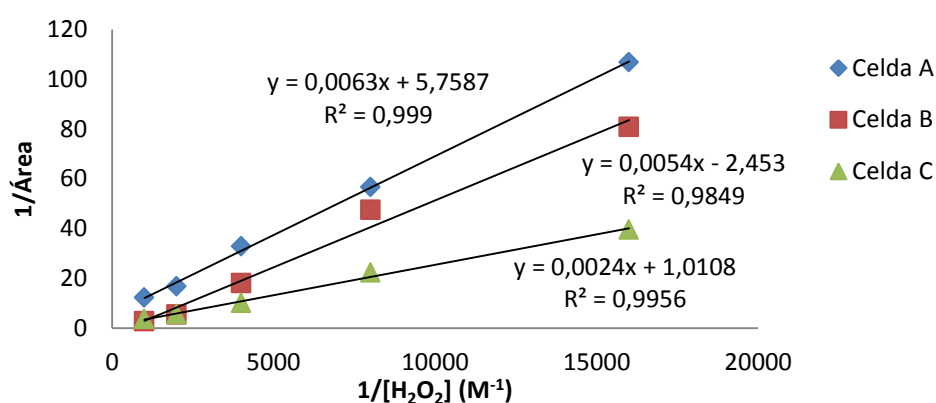


Figura 14. Relación entre el inverso del área dada por las señales de absorbanza de la lámina HRP 52 UI/mL y el inverso de la concentración de H_2O_2 en la celda A, B y C con la placa B.

A modo de resumen se presenta la tabla 2, donde se recogen las pendientes de cada una de las representaciones anteriores:

	Placa A		Placa B	
	Pte.	s	Pte.	s
Celda A	0,0474	0,0026	0,0063	0,0001
Celda B	0,0047	0,0002	0,0054	0,0004
Celda C	0,0122	0,0005	0,0024	0,0001

Tabla 2. Pendientes y sus desviaciones extraídas de las representaciones de las figuras 12 y 13.

De este estudio se puede deducir que las celdas que proporcionan mayor sensibilidad con ambas placas son B y C, lo cual demuestra que los cambios de ambas celdas respecto a la celda A, contribuyen a una mejora de la focalización de la luz, evitan la dispersión y mejoran la sensibilidad.

Debido a que las diferencias de sensibilidad entre las celdas B y C no son significativas, la elección de una celda u otra no dependerá de criterios analíticos, se decide la elección de la celda B ya que la lámina sensora tiene menores dimensiones y se necesita menor cantidad de disolución en la preparación de la misma.

Con este estudio se puede también corroborar que la placa B proporciona respuestas más sensibles.

Debido a que para cada estudio celda-placa, se prepararon láminas nuevas (para obtener las señales en las mismas condiciones de la enzima), para confirmar la robustez de los resultados y asegurar que los cambios entre una celda y otra no son debidos a la lámina, se realizó un estudio comparativo usando la misma lámina y los mismos leds (placa B) en las celdas B y C para una misma concentración de H_2O_2 , realizando tres réplicas para cada una y obteniéndose los siguientes resultados.

	Celda B	Celda C
Media áreas	0,0510	0,05262
s	0,0013	0,0007

Tabla 3. Media de las áreas de las respuesta de tres réplicas de la reacción entre una lámina HRP 52 UI/mL y H_2O_2 $5 \cdot 10^{-4} M$ para las celdas B y C usando la placa B.

Realizado un test t ($P=0,05$) para varianzas iguales, se comprobó que no hay diferencias significativas entre los resultados, por lo que se puede confirmar la robustez de los mismos.

4.1.4 Evaluación del tiempo de vida de la lámina y reproducibilidad

Se realizó un estudio del tiempo de vida de la lámina sensora de HRP, durante tres días usando una misma concentración de H_2O_2 . Se realizaron un total de 60 medidas con esta lámina de HRP y se compararon las áreas de las señales obtenidas.

	Día 1	Día 2	Día 3
Media áreas	0,0304	0,0295	0,0289
s	0,0009	0,0021	0,0043

Tabla 4. Media de las áreas y desviaciones estándar de las respuesta de una lámina HRP 52 UI/mL y H_2O_2 $5 \cdot 10^{-4} M$ durante tres días (60 medidas).

Los resultados obtenidos se compararon mediante el test ANOVA y se comprobó que a una probabilidad del 0,05 no hay diferencias significativas (Anexo 8).

4.1.5 Intervalo de respuesta lineal

Una vez realizada la optimización del módulo óptico se llevó a cabo un estudio del intervalo lineal de respuesta usando la celda B y la placa B, que como se ha demostrado, proporcionan las mejores respuestas.

Se llevó a cabo la reacción de la lámina HRP con diversas concentraciones de H_2O_2 , del tratamiento de cada uno de los picos se obtuvieron las áreas para cada una de las concentraciones. Tras realizar

un ajuste lineal por mínimos cuadrados de la inversa de las áreas y las inversas de las concentraciones se obtienen los datos que se representan en la siguiente figura:

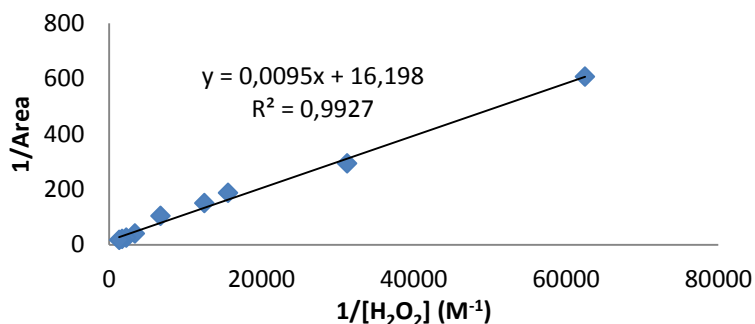


Figura 15. Relación entre el inverso del área dada por las señales de absorbancia de la lámina HRP 52 UI/mL y el inverso de la concentración de H_2O_2 .

Como se puede comprobar, realizando el ajuste lineal por mínimos cuadrados, el método presenta un rango de respuesta lineal de $1,5 \cdot 10^{-5} - 7,6 \cdot 10^{-4} M$. (Anexo 9)

4.1.6 Aplicación a una muestra real

Se evaluó la optimización realizada y la aplicación del método analizando una muestra real y obteniendo su concentración por interpolación en la recta de calibrado. Para ello se realizó primero una calibración de la respuesta de la lámina sensora que se iba a utilizar, usando tres disoluciones que cubrieran el rango lineal:

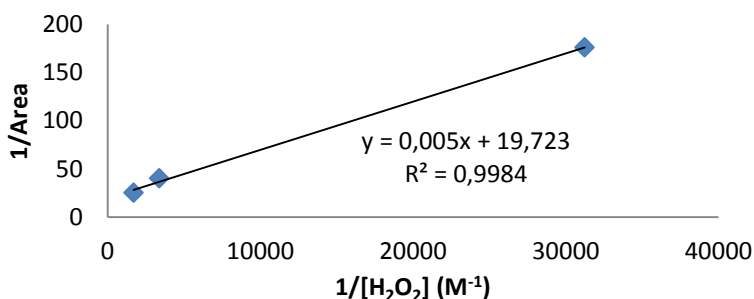


Figura 16. Relación entre el inverso del área dada por las señales de absorbancia de la lámina HRP 52 UI/mL y el inverso de la concentración de H_2O_2 para tres concentraciones de calibrado.

A continuación se llevó a cabo el análisis de la muestra, realizándose tres réplicas y obteniendo los siguientes resultados:

1/Área	$[H_2O_2] (M)$
35,1989	3,2308E-04
35,2983	3,2102E-04
35,3032	3,2092E-04
Media	3,2167E-04
s	1,2192E-06

Tabla 5. Áreas obtenidas en las réplicas de análisis de la muestra junto con su correspondiente concentración interpolando en la recta, su media y su desviación estándar.

Interpolando las áreas en la recta de calibrado, obtenemos sus concentraciones y de la media de éstas, una concentración de la muestra proporcionada por el método de $3,2167 \cdot 10^{-4}$ M.

Para la comparación de los resultados se valoró la misma disolución diluida de agua oxigenada comercial con una disolución de permanganato potásico de concentración conocida, como agente valorante¹⁰. Como se explica en la parte experimental, se realizaron tres réplicas obteniéndose los siguientes resultados:

Réplicas	[H ₂ O ₂] (M)
1	3,5786E-04
2	3,6248E-04
3	3,6017E-04
Media	3,6017E-04
s	2,3080E-06

Tabla 6. Concentraciones obtenidas en cada valoración de la muestra junto con su media y desviación estándar.

Como se observa, la concentración de la muestra proporcionada por el método fue $3,601 \cdot 10^{-4}$ M.

Suponiendo como valor real el obtenido mediante el método normalizado, obtenemos un error del 10,69%, aceptable para este tipo de determinaciones.

Con esto podemos concluir que los resultados obtenidos mediante el sensor óptico proporcionan resultados similares a los obtenidos por el método normalizado, pudiéndose establecer así este como un método adecuado para la determinación de peróxidos en muestras reales.

4.2 Biosensor para la determinación de otros peróxidos

Con el fin de completar la determinación de muestras de biocidas y desinfectantes, se pretende también estudiar las posibilidades de la reacción enzimática de la catalasa para la determinación de peróxidos, en este caso de ácido peracético.

Estudios anteriores¹² demostraron que, según el modelo matemático, existe una relación lineal entre la señal de absorbancia y la concentración de ácido peracético, por tanto para el estudio de esta reacción se aplicará el modelo citado.

4.2.1 Estudio en disolución

En primer lugar se comenzó con el seguimiento de la reacción enzimática, a partir de las propiedades espectroscópicas de la enzima, realizándose para ello los espectros de absorción molecular de la enzima.

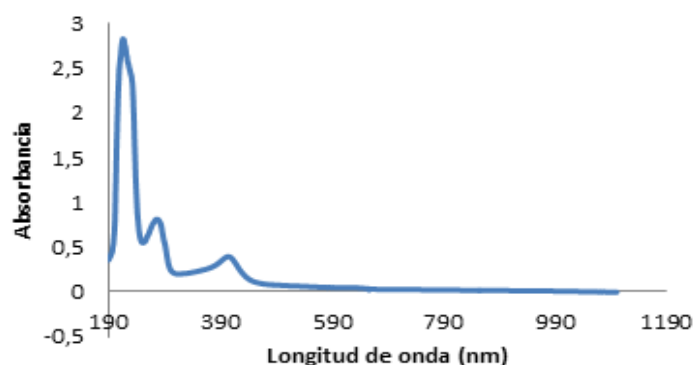


Figura 17. Espectro de absorción molecular de catalasa $3,66 \cdot 10^{-6}$ M.

En la figura se observa que la enzima presenta máximos de absorción en la zona del UV (220 y 280 nm) debido a los aminoácidos aromáticos. Otra zona a la que absorbe es la zona del visible, 406 nm, esta zona es la más adecuada para trabajar y se realizara el seguimiento de la reacción a través de las variaciones de la señal a esta longitud de onda.

Se obtuvieron los espectros tras hacer reaccionar la misma cantidad de catalasa ($3,66 \cdot 10^{-6}$ M) con diferentes concentraciones de ácido peracético. Mediante la representación de la Δ Abs producida por la formación del producto según la cantidad de peróxido de hidrogeno adicionada, se obtienen los datos que se representan en la siguiente figura.

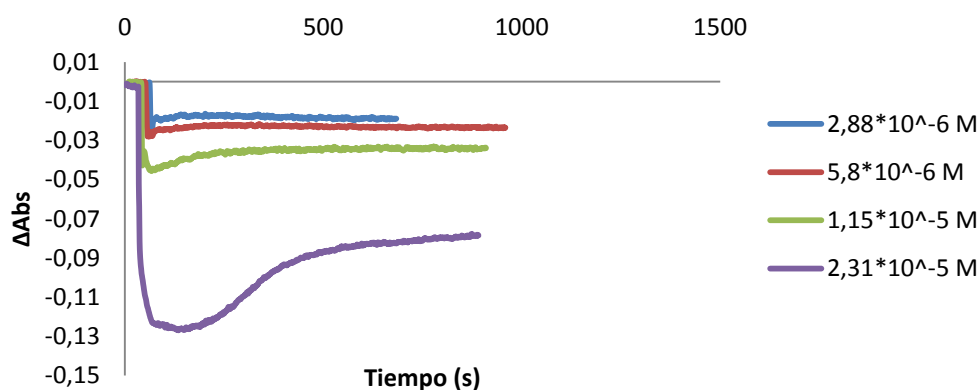


Figura 18. Variación de la Abs a 406 nm para la reacción de catalasa $3,66 \cdot 10^{-6}$ M con diferentes concentraciones de ácido peracético en disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ 0,1M pH=8

A partir de la figura anterior, representando la Δ Abs que sufre la enzima a 406 nm, según la cantidad de ácido peracético adicionado y ajustando los datos por el método de mínimos cuadrados, se obtiene la siguiente representación.

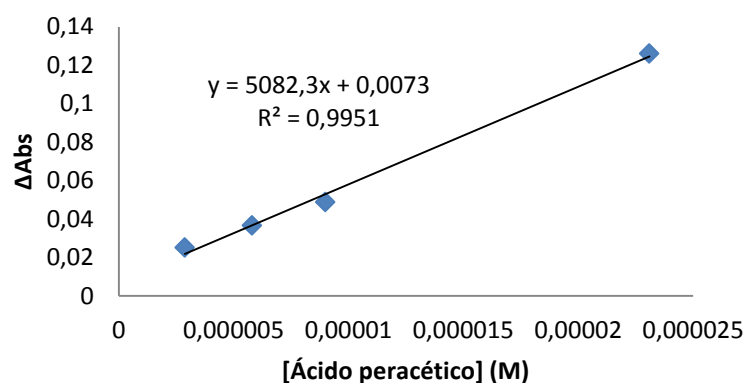


Figura 19. Relación entre la variación de Abs de una disolución de catalasa $3,66 \cdot 10^{-6}$ M y la concentración de ácido peracético en disolución amortiguadora $H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$ 0,1M pH=8

Como se puede comprobar, el método presenta un rango de respuesta lineal de $2,88 \cdot 10^{-6}$ - $2,31 \cdot 10^{-5}$ M.

4.2.2 Estudio en celda de flujo

Antes de la implementación de la lámina al sensor óptico enzimático, con el fin de obtener una información más completa de la respuesta y las características de la lámina sensora, se estudió la reacción en celda de flujo en el espectrofotómetro de absorción. En primer lugar se obtuvo el espectro de absorción molecular de la enzima entrampada en la red de PAA.

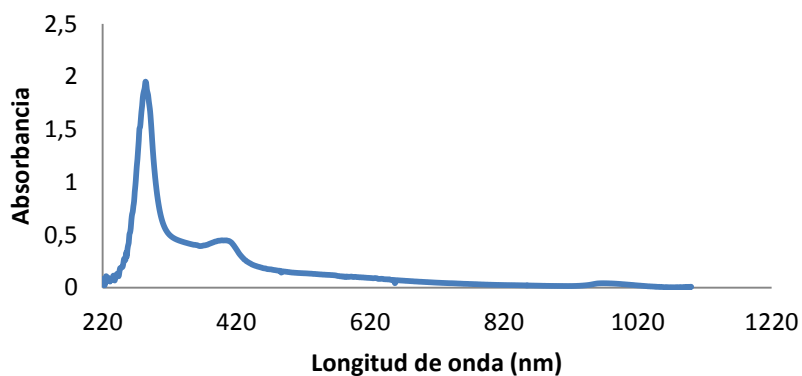


Figura 20. Espectro de absorción molecular de peroxidasa catalasa $5,5 \cdot 10^{-5}$ M en lámina sensora.

Mediante el estudio de la reacción en celda de flujo, se observa que en el máximo de 406 nm, la enzima presenta un mismo comportamiento que en disolución. Representando el registro cinético a 406 nm de la reacción de la lámina de catalasa $5,5 \cdot 10^{-5}$ M con diversas concentraciones de ácido peracético, se obtienen respuestas del siguiente tipo:

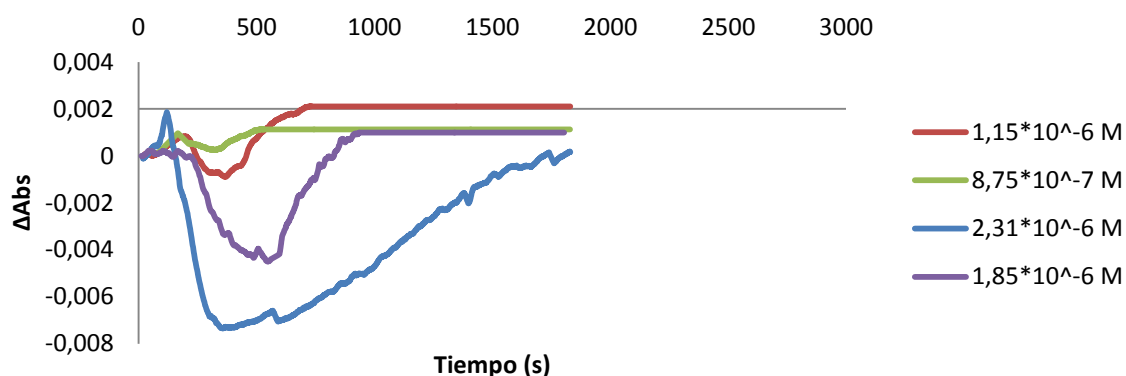


Figura 21. Variación de la Abs a 406 nm para la reacción entre una lámina de catalasa $5,5 \cdot 10^{-5}$ M con diferentes concentraciones de ácido peracético en disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1M pH=8

A partir de la figura anterior, es posible representar la ΔAbs que sufre la enzima a 406 nm, según la cantidad de ácido peracético adicionado.

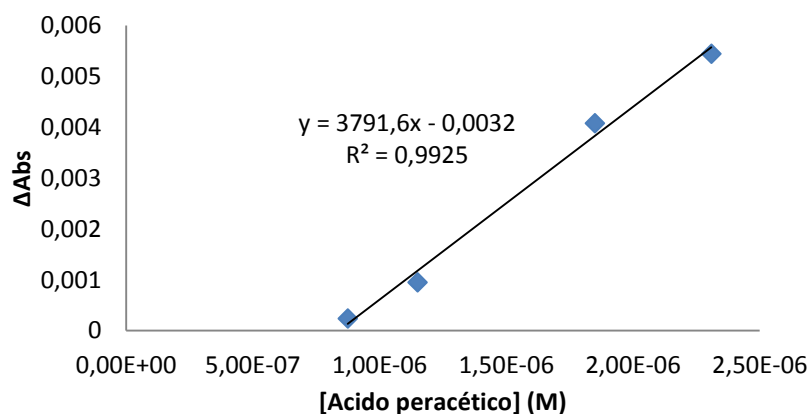


Figura 22. Relación entre la variación de Abs entre una lámina de catalasa $5,6 \cdot 10^{-5}$ M y la concentración de ácido peracético en disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1M pH=8

Como se puede comprobar, el método presenta un rango de respuesta lineal de $8,75 \cdot 10^{-7}$ M- $2,31 \cdot 10^{-6}$ M.

A partir de estos resultados se puede asegurar que la reacción de ácido peracético con catalasa puede ser utilizada como base de un biosensor óptico enzimático, por lo que el próximo paso será la optimización del biosensor basado en catalasa para la determinación del analito, pero cuyo objetivo queda fuera del alcance de este trabajo.

5. CONCLUSIONES

En esta memoria se ha llevado a cabo la puesta a punto de un biosensor óptico enzimático para la determinación de peróxidos. Las conclusiones que se pueden extraer del trabajo realizado son las siguientes:

1. Se ha estudiado en disolución la reacción enzimática de HRP con peróxido de hidrógeno obteniéndose un intervalo de respuesta lineal de $8 \cdot 10^{-7}$ - $7 \cdot 10^{-6}$ M.
2. Se ha inmovilizado la enzima en una lámina sensora y se ha estudiado la reacción enzimática en una celda de flujo, obteniéndose un intervalo de respuesta lineal de $7,5 \cdot 10^{-6}$ - $7,5 \cdot 10^{-5}$ M.
3. Se ha optimizado el desarrollo de la lámina sensora de HRP, para su implementación en el biosensor óptico variando la proporción de persulfato de amonio, aumentando así la estabilidad de la lámina y mejorando su sensibilidad.
4. Se ha seleccionado el área como parámetro analítico para el estudio del método.
5. Como fuente de excitación, los mejores resultados se han obtenido utilizando un led de 470 nm para la medida y uno de 525 nm para la referencia, obteniéndose con éstos respuestas mayores y más sensibles.
6. Se ha llevado a cabo el diseño de tres celdas sensoras, variando su paso óptico, para mejorar la sensibilidad y su ancho, para disminuir la dispersión de la luz led.
7. Se ha realizado el seguimiento de la reacción con las diversas celdas, obteniéndose mejores resultados en aquellas cuyo ancho había sido aumentado (celda B y celda C). Debido a que las diferencias de sensibilidad entre éstas no fueron significativas, se ha seleccionado la celda B debido a criterios no analíticos como son las dimensiones menores de ésta.
8. Se ha evaluado la robustez del método realizando un estudio comparativo usando la misma lámina y los mismos leds para dos celdas distintas y una misma concentración, obteniéndose que no hay diferencias significativas entre los resultados.
9. Se ha estudiado el tiempo de vida de la lámina y su reproducibilidad y se ha determinado un límite de 60 medidas para la obtención de resultados reproducibles.
10. El método permite la determinación de peróxido de hidrógeno en un intervalo lineal de $1,5 \cdot 10^{-5}$ - $7,6 \cdot 10^{-4}$ M.
11. Se ha evaluado la optimización realizada mediante el análisis de una muestra real y comparando los resultados con la determinación por métodos normalizados, obteniéndose un error del 10,69%, aceptable para este tipo de determinaciones y pudiéndose establecer así este como un método adecuado para la determinación de peróxido de hidrógeno en muestras reales.
12. Se ha evaluado la posibilidad de ampliar la metodología a la determinación de otros peróxidos para lo que se ha estudiado en disolución la reacción enzimática de catalasa-ácido peracético, obteniéndose un intervalo de respuesta lineal de $2,88 \cdot 10^{-6}$ - $2,31 \cdot 10^{-5}$ M.
13. Se ha desarrollado una lámina sensora mediante entrapamiento de catalasa en poliacrilamida y se ha realizado el seguimiento de la reacción enzimática del analito en celda de flujo, obteniéndose un intervalo de respuesta lineal de $8,75 \cdot 10^{-7}$ M - $2,31 \cdot 10^{-6}$ M.
14. Estos resultados nos permiten asegurar que esta reacción puede ser utilizada para la determinación de peróxidos en muestras de aguas y por tanto la implementación de esta metodología en un biosensor óptico enzimático será el objetivo de futuros trabajos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. D.R. Thévenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, *Biosensors and Bioelectronics*. **2001**, 16, 121-131.
2. A.D. McNaught, A. Wilkinson, IUPAC, *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the “Gold Book”): Blackwell Science Oxford **1997**.
3. J. Galbán, V. Sanz V, E. Mateos, I. Sanz-Vicente, A. Delgado-Camon, S. de Marcos, *Protein and peptide Letter*. **2008**, 15, 772-778
4. J. Galbán, I. Sanz-Vicente, E. Ortega, M. del Barrio, S. de Marcos, *Analytical and bioanalytical chemistry*. **2012**, 402, 3039-3054.
5. E. Linley, S.P. Denyer, G. McDonnell, C. Simons, J.Y. Maillard. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2012**, 67(7), 1589-96.
6. V. Sanz, S. de Marcos, J.R. Castillo, J. Galbán. *J.Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 1038-1048.
7. J. Galbán , Y. Andreu, J.F. Sierra, S. de Marcos, J.R Castillo, *Luminescence*. **2001**, 16, 199-210.
8. N. Durán et al. *Enzyme and Microbial Technology*. **2002**, 31, 402-406.
9. S. de Marcos, E. Callizo, E. Mateos, J. Galbán, *Talanta*. **2014**, 122, 251-256.
10. Norma UNE EN 902:2000. Productos químicos utilizados para el tratamiento de agua destinada al consumo humano. Peróxido de hidrógeno. CTN: AEN/CTN 77/SC 1 - AGUA.
11. V. Sanz, S. de Marcos, J. Galbán. *Anal. Chim.Acta*. **2007**, 583(2), 332-339.
12. J. Galbán, V. Sanz, S. de Marcos, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 398, 2117–2124.